

EFEK ISOFLAVON FITOESTROGEN DARI EKSTRAK *Pueraria lobata* TERHADAP MEMORI DAN AKTIVITAS KOLINERGIK DI HIPPOKAMPUS CA1 PADA TIKUS HIPOESTROGEN

Fathiyah Safithri*, Mulyohadi Ali**, A. Hidajat***, Setyawati S**

Abstract

Data from retrospective and case-control showed that estrogen replacement therapy (ERT) could prevent and delayed against Alzheimer Disease (AD). The using of ERT is still controversial because of their long-term side effect. Isoflavon as a part of phytoestrogen has potential effect as an alternative substitute for ERT. The aim of this study is to examine the effect of phytoestrogen from *Pueraria lobata* extract in increasing memory's function and whether it occur by the increased of cholinergic activity in CA1 hippocampus. Exploration study performed by three step. First, determined genistein and daidzein concentration in *Pueraria lobata* extract, as basic of dose determining. Second, oophorectomy performed to made a hypoestrogenic rat's model; and third, determined method memory's function in rats. This study used twenty five female *Rattus novergicus* strain Wistar, 10 -11 weeks of age, five rats were normal rats (N) as first group and twenty rats were hypoestrogenic rats for 2nd, 3rd, 4th, and 5th groups. All of the hypoestrogenic rat were divided into 4 groups, each 5 rats. Hypoestrogenic rats group without Isoflavon Genistein Daidzein supplement (OVX), hypoestrogenic rats group with Isoflavon Genistein Daidzein supplement (OVX+IGD) dosage of 15, 30, and 60 mg/kgweight/day each. The IGD was given for 21 days. The Morris Water Morris (MWM) test was performed in 17th, 18th, 19th, 20th, and 21st day. On 22nd day rats were killed. Frozen section of the brain was performed immediately. Cholinergic activities on CA1 hippocampus were examined with AChE staining. A significant difference was found on memory's function and cholinergic activities on CA1 hippocampus between OVX and OVX+IGD groups at all doses (p value = 0,000 of each). No significant difference on IGD effect toward brain weight ($p=0,936$) and pyramidal cell number on CA1 hippocampus ($p=0,961$). It was suggest that increased memory's function on OVX+IGD groups were caused by the increased of cholinergic activities on CA1 hippocampus.

Key word : Isoflavones; phytoestrogen; Genistein; Daidzein; *Pueraria lobata*; Memory; cholinergic.

Abstrak

Data epidemiologi dari studi retrospektif maupun case-control telah menunjukkan bahwa Terapi Sulih Estrogen (TSE) dapat mencegah ataupun memperlambat terjadinya penyakit Alzheimer (PA). Pemakaian TSE selama ini masih banyak kontroversi berkaitan dengan masalah efek samping jangka panjang. Isoflavon yang merupakan bagian dari fitoestrogen diketahui berpotensi sebagai alternatif pengganti TSE. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah isoflavon fitoestrogen dari ekstrak *Pueraria lobata* dapat meningkatkan fungsi memori dan sekaligus untuk mengetahui apakah peningkatan fungsi memori tersebut melalui peningkatan aktifitas kolinergik di hippocampus, karena selama ini gangguan memori sering dihubungkan dengan penurunan aktivitas kolinergik. Penelitian ini diawali dengan studi pendahuluan yang dilakukan untuk menentukan kadar genistein dan daidzein dalam ekstrak *Pueraria lobata*, kedua, untuk membuat model tikus hipoestrogen melalui ooforektomi dan ketiga, untuk menentukan metode apa yang akan dipakai untuk menilai fungsi memori tikus. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus betina strain Wistar usia 10-11 minggu yang terdiri dari 1 kelompok tikus normal (N) dan 4 kelompok tikus hipoestrogen. Kelompok tikus hipoestrogen ini terdiri dari kelompok OVX, dan 3 kelompok OVX yang diberi Isoflavon Genistein Daidzein (IGD) ekstrak *Pueraria lobata* dengan dosis masing 15, 30 dan 60mg/kgBB/br. Pemberian IGD ekstrak *Pueraria lobata* dilakukan per sonde lambung selama 21 hari. Tes memori dengan metode Morris Water Maze (MWM) dilakukan pada hari ke-17, 18, 19, 20 dan 21. Hari ke-22 tikus dimatikan, diambil otaknya, kemudian dipotong secara frozen section dan terakhir dilakukan pengecatan AChE untuk mengukur aktivitas kolinergik hippocampus. Didapatkan peningkatan fungsi memori dan aktivitas kolinergik pada kelompok OVX+IGD pada semua dosis dibanding kelompok OVX (p masing-masing=0,000). Tidak didapatkan perbedaan pengaruh nyata terhadap berat otak ($p=0,936$) dan jumlah sel piramidal hippocampus CA1 ($p=0,961$) antara kelompok OVX dan kelompok OVX+IGD pada semua dosis. Diduga peningkatan fungsi memori akibat pemberian IGD dari ekstrak *Pueraria lobata* terjadi salah satunya melalui peningkatan aktivitas kolinergik di CA1 hippocampus.

Kata kunci : Isoflavon; Fitoestrogen; Genistein; Daidzein; *Pueraria lobata*; Memori; Kolinergik.

*Mahasiswa Program Studi Biomedik Pasca Sarjana Universitas Brawijaya

**Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

***Bagian Ilmu Kebidanan dan Kandungan Rumah Sakit Saiful Anwar

PENDAHULUAN

Dengan bertambah majunya pembangunan terutama pembangunan bidang kesehatan, maka semakin meningkat pula usia harapan hidup. Dengan meningkatnya usia harapan hidup, proporsi perempuan lanjut usia (lansia) juga mengalami peningkatan. Menurut data hasil Sensus Penduduk Indonesia oleh Badan Pusat Statistik tahun 1997 jumlah penduduk wanita mencapai 100,9 juta orang, termasuk di dalamnya 14,3 juta wanita menopause, (BPS, 1997) sedangkan pada tahun 2000 jumlah wanita meningkat menjadi 102,8 juta jiwa. dengan jumlah wanita menopause mencapai 15,5 juta. (BPS, 2000). Berbagai masalah fisik biologik, psikologik, dan sosial akan muncul pada usia lanjut sebagai akibat dari proses menua dan atau penyakit degeneratif yang muncul seiring dengan pertambahan usia termasuk penyakit demensia tipe alzheimer (Kandell ER dkk, 2000)

Estrogen dapat melindungi otak dari proses degenerasi tersebut. Salah satu tempat kerja estrogen di otak adalah di hippocampus, yaitu suatu area di otak yang bertanggung jawab pada fungsi memori. (McEwen BS, 2001, Jellinger KA, 2001). Subregio CA1 merupakan regio di hippocampus yang paling sering mengalami gangguan pada PA Data epidemiologi dari studi retrospektif maupun case-control menunjukkan bahwa Terapi Sulih Estrogen (TSE) dapat meningkatkan fungsi kognisi pada wanita postmenopause (Asthana dkk, 1999, 2001; Henderson dkk, 2000; Mulnard RA, 2000) Dan pada saat terapi tersebut dihentikan, kemampuan memori dan perhatian menurun (Asthana dkk, 1999). Namun pemakaian TSE ini mempunyai beberapa kendala, di samping harganya mahal, TSE juga meningkatkan resiko terjadinya karsinoma uterus maupun karsinoma mammae. Ketakutan terhadap kanker ini menyebabkan sebagian besar wanita menopause menolak untuk menggunakan TSE (Rabin DS, 1998).

Fitoestrogen adalah suatu molekul dari tanaman yang secara struktur mirip dengan estrogen endogen. Fitoestrogen secara langsung dapat berikatan dengan reseptor estrogen (RE) dan berkompetisi dengan estrogen endogen, sehingga ia dapat memberikan efek estrogenik maupun anti- estrogenik. Fitoestrogen yang mempunyai 2 sifat campuran tersebut dipandang menguntungkan dan diharapkan dapat dipakai sebagai alternatif pengganti TSE (Adlercreutz H, 1998).

Salah satu sumber utama fitoestrogen yang telah lama dikenal adalah kedele(soy) dengan komponen utamanya isoflavon. Berbagai penelitian baik epidemiologis, klinis maupun eksperimental laboratoris telah menyimpulkan bahwa isoflavon dari kedele mempengaruhi fungsi kognisi dan memori. Penelitian epidemiologis oleh Nagata C, dkk, 1999, menyimpulkan bahwa kasus demensia di Asia lebih sedikit dibanding di Eropa dan diketahui bahwa masyarakat Asia banyak mengkonsumsi

kedele (Nagata C, dkk, 1999). Suatu studi klinik yang dilakukan Duffy dkk, 2001 menyimpulkan bahwa pemberian suplemen isoflavon dari kedele dapat memperbaiki memori wanita paska menopause. Penelitian eksperimental oleh Lund dkk, 2001 menyimpulkan bahwa melalui tes memori Radial-Arm Maze terbukti kemampuan memori tikus betina yang diberi diet fitoestrogen 600 ig/gr diet meningkat. Penelitian lain oleh Pan dkk, 1999 menyatakan bahwa pemberian diet soy bean selama 8 minggu pada tikus paska ooforektomi dapat meningkatkan kadar ChAT, mRNA BDNF, dan mRNA NGF di korteks frontal dan hippocampus (Duffy dkk, 2001; Lund dkk, 2001, Pan Y dkk, 1999)

Saat ini kelompok studi fitoestrogen PERMI Malang telah berhasil mengidentifikasi dan mengisolasi isoflavon dari beberapa tanaman non kedele lokal yaitu *Pueraria lobata*/*Kudzu root*, kacang tunggak (*Pueraria phaseoloides*), lidah buaya (*aleo vera*) dan biji bunga matahari (*beliocantus*) (Hidayat A, 2003). Khusus tentang *Pueraria lobata*, telah diketahui bahwa kandungan isoflavonnya sebesar 197.600 ig/100gr berat *Pueraria lobata* kering, lebih tinggi daripada kedele yang mempunyai kandungan isoflavon sebesar 37.300-187.500 µg/100gr berat kedele kering (Mazur dkk, 1998). Sejauh ini belum banyak penelitian tentang *Pueraria lobata* dilakukan, khususnya tentang efek *Pueraria lobata* pada fungsi memori. Sehingga layak dipertanyakan apakah *Pueraria lobata* ini juga dapat memperbaiki fungsi memori seperti halnya dengan kedele.

Untuk membuktikan apakah pemberian isoflavon genistein daidsein dari ekstrak *Pueraria lobata* dapat meningkatkan memori *Rattus norvegicus* Wistar dalam kondisi hipoestrogen melalui peningkatan aktivitas kolinergik di CA1 hippocampus, maka kami melakukan suatu penelitian eksperimental dengan hewan coba tikus Wistar yang diberi ekstrak *Pueraria lobata*. Pada penelitian ini pengukuran fungsi memori dilakukan melalui tes memori *Morris-water Maze* dan pengukuran aktivitas kolinergik di CA1 hippocampus dilakukan dengan menghitung jumlah sel piramidal CA1 hippocampus yang mengekspresi asetilkolin esterase (AChE).

METODE PENELITIAN

Strategi Pendekatan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek isoflavon genistein daidsein (IGD) dari ekstrak *Pueraria lobata* terhadap memori dan aktivitas kolinergik daerah CA1 hippocampus pada keadaan hipoestrogen. Penelitian ini menggunakan pendekatan eksperimental yang dilakukan pada hewan coba. Alasan yang mendasari hal tersebut adalah bahwa untuk membuktikan IGD dari ekstrak *Pueraria lobata* mempunyai aktivitas estrogenik dan berefek pada memori tikus, perlu dibuat suatu

model tikus hipoestrogen melalui tindakan ooforektomi (OVX) dan hal ini hanya mungkin dilakukan dengan hewan coba. Disamping itu dengan hewan coba, faktor-faktor yang dapat menimbulkan bias lebih mudah dikendalikan. Hewan coba yang dipakai pada penelitian ini adalah tikus, karena tikus mempunyai kelebihan yaitu profil *behaviour* dan neurotransmitternya hampir sama dengan manusia. Disamping itu dibanding dengan mice ataupun marmut, tikus lebih tahan terhadap perlakuan (ooforektomi) serta mempunyai ukuran tubuh sedang sehingga memudahkan untuk dilakukan ooforektomi.

Pengukuran fungsi memori pada penelitian ini dilakukan dengan metode Morris-Water Maze karena metode ini cukup sensitif untuk melihat fungsi hippocampus. Latihan (berenang) meningkatkan neurogenesis di dentata gyrus hippocampus (Gage dkk, 1998). Aktivitas fisik yang disadari seperti berenang dalam kolam meningkatkan jumlah sel baru di hippocampus (Van Praag dkk, 1999). Pada penelitian ini untuk menilai aktivitas kolinergik di hippocampus dilakukan pengukuran kadar asetilkolin (ACh) di hippocampus tikus secara tidak langsung, yaitu melalui pengecatan asetilkolinesterase (AChE). Alasan yang mendasari hal tersebut adalah karena AChE merupakan enzim pemecah ACh yang terdapat di sinap. Begitu ACh dilepas ke sinap, maka AChE dalam waktu milidetik akan langsung memecahnya. Jika ACh yang dilepaskan di sinap meningkat, aktivitas AChE juga akan meningkat. Telah dibuktikan bahwa pada saat aktivitas ChAT, yaitu enzim pembentuk ACh meningkat, didapatkan aktivitas AChE meningkat dan densitas AChE pada pengecatan histokimia juga meningkat. Jadi pengecatan histokimia AChE merupakan marker yang baik untuk menilai fungsi kolinergik (Guela & Mesulam, 1996)

Desain Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimental dengan metode rancangan acak lengkap. Perlakuan dilaksanakan dengan pemberian ekstrak *Pueraria lobata* yang mengandung IGD dengan dosis 15, 30, dan 60 mg/kgBB/hr pada 25 ekor *Rattus Novergicus* strain Wistar, betina, usia 8-10 minggu, BB 110 –120 gram. Tikus-tikus tersebut dibagi dalam 5 kelompok perlakuan, yaitu Kelompok Kontrol Normal (N), kelompok ooforektomi (OVX), Kelompok OVX dengan pemberian IGD dosis 15 mg/kgBB, kelompok OVX + IGD dosis 30 mg/kgBB/hr, dan kelompok OVX + IGD dosis 60 mg/kgBB dengan jumlah tikus tiap perlakuan adalah 5 ekor.

HASIL PENELITIAN

Hasil Studi Pendahuluan Pembuatan Tikus Hipoestrogen melalui Metode Ooforektomi.

Data studi eksplorasi dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Efek Ooforektomi terhadap Kadar Estradiol, FSH, Gambaran Papsmear, Berat Uterus dan Rerata tebal endometrium.

No.	Perlakuan	n	Kadar Estradiol (pg/mL)	Kadar FSH (mIU/mL)	Gambaran Papsmear	Rerata Berat Uterus (gram)	RerataTebal Endometrium (mm)
1.	Kontrol Normal	2	20,05 9,94	< 0,10	Dominasi epitel superfisial Dominasi epitel parabasal dan intermedier	1,1740	1
2.	Paska OVX 2 minggu	2	< 9	<0,10	Dominasi epitel parabasal dan intermedier	0,5477	0,5
3.	Paska OVX 4 minggu	2	< 9	<0,10	Dominasi epitel parabasal dan intermedier	0,2714	0,3

Tes Memori Morris Water Maze (MWM)

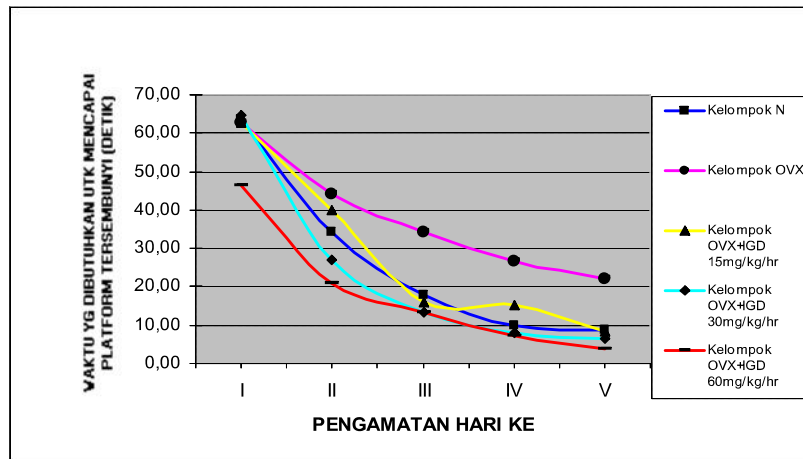
Hasil pengukuran terhadap waktu yang dibutuhkan tikus untuk mencapai *hidden platform* tampak pada Tabel 2 dan Gambar 1.

Tabel 2. Efek Isoflavon Fitoestrogen dari Ekstrak *Pueraria lobata* pada waktu yang dibutuhkan tikus untuk mencapai *hidden platform*

Perlakuan	Rerata Waktu yang Dibutuhkan untuk Mencapai Hidden Platform (detik)				
	Pada Pengamatan Hari ke-				
	I	II	III	IV	V
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Normal	63,60 ± 21,762	34,35 ± 10,468	17,80 ± 2,361	9,95 ± 5,197	8,90 ± 3,324
OVx	64,93 ± 35,570	45,00 ± 25,066	34,57 ± 24,575	26,78 ± 13,811	22,25 ± 10,025
OVx + IGD 15mg/kgBB/hr	62,65 ± 13,776	39,85 ± 25,138	15,85 ± 2,051	15,10 ± 5,447	8,20 ± 1,165
OVx + IGD 30mg/kgBB/hr	64,50 ± 9,182	27,20 ± 12,376	13,30 ± 3,488	7,90 ± 1,098	6,53 ± 0,742
OVx + IGD 60mg/kgBB/hr	46,55 ± 8,506	20,80 ± 6,389	13,35 ± 5,779	7,40 ± 1,901	3,90 ± 1,098

Keterangan :

- Pengamatan Hari I, II, III, IV, V = hari ke-17, 18, 19, 20, dan 21
- Uji statistika MANOVA menunjukkan ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan (p value = 0.030 (Pillai), p value = 0.004 (Wilks) dan p value = 0.000 (Hotelling dan Trace).
- Uji statistika ANOVA menunjukkan ada perbedaan bermakna pada hari III (p=0,043), hari IV (p=0,002), dan hari V (p=0,000)
- Uji Perbandingan Berganda LSD menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok OVX dengan kelompok OVX+IGD 15, 30, dan 60 mg/kg/hr (p masing-masing=0,000)
- Nilai ditunjukkan dalam rata-rata ± SD (n=5)



Gb. 1 Tes Memori Morris Water Maze setelah pemberian Isoflavon Genistein Daidzein dari Ekstrak Pueraria lobata

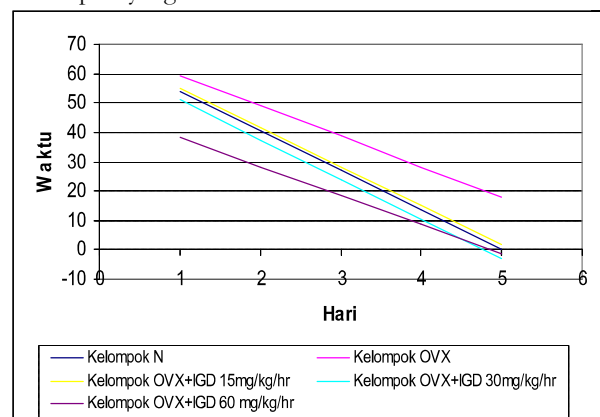
Keterangan :

- Uji statistika MANOVA menunjukkan ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan (p value = 0.030 (Pillai), p value = 0.004 (Wilks) dan p value = 0.000 (Hotelling dan Trace).
- Uji statistika ANOVA menunjukkan ada perbedaan bermakna pada hari III ($p=0,043$), hari IV ($p=0,002$), dan hari V ($p=0,000$)
- Uji Perbandingan Berganda LSD menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok OVX dengan kelompok OVX+IGD 15, 30, dan 60 mg/kg/hr (p masing-masing=0,000)

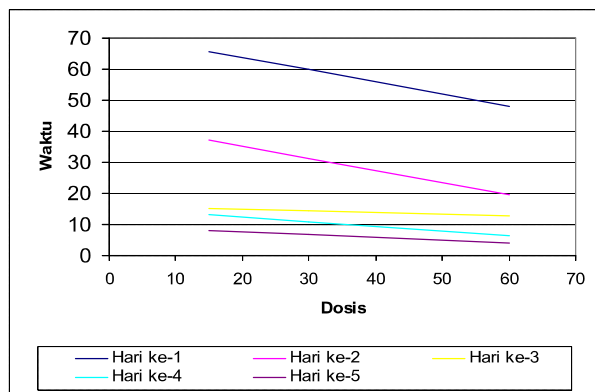
Tes MWM menunjukkan bahwa ada kecenderungan yang sama pada semua kelompok bahwa waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform* sejak tes hari I sampai dengan hari V makin menurun, dalam arti ada pengurangan waktu yang dibutuhkan untuk mengingat dari hari ke hari (gb. 1). Hal ini berarti makin sering berlatih maka waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform* semakin sedikit.

Gambar. 1 menunjukkan bahwa grafik yang dibentuk masing-masing kelompok mempunyai kelandaian yang berbeda-beda. Uji statistika MANOVA antar 5 kelompok perlakuan terhadap waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform* pada keseluruhan hari tes menunjukkan perbedaan bermakna dengan p value = 0.030 (Pillai), p value = 0.004 (Wilks) dan p value = 0.000 (Hotelling dan Trace). Uji statistika ANOVA menunjukkan ada perbedaan yang bermakna terhadap waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform* pada tes hari III ($p=0,032$), IV ($p=0,001$), dan V ($p=0,000$). Uji Perbandingan berganda LSD menunjukkan ada perbedaan bermakna antara kelompok OVX+IGD semua dosis dengan kelompok OVX (p masing-masing 0,000)

Analisa regresi (gambar 2) antara hari dengan waktu yang diperlukan untuk mencapai *hidden platform* pada masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan bahwa hari tes berpengaruh negatif terhadap waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform*, yang berarti bahwa makin banyak hari tes maka makin sedikit waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform*. Koefisien regresi bermakna pada semua kelompok, yaitu kelompok 1 ($p=0,025$, $R^2=85,4\%$), kelompok 2 ($p=0,009$, $R^2=92,7\%$), kelompok 3 ($p=0,020$, $R^2=87,3\%$), kelompok 4 ($p=0,045$, $R^2=78,6\%$), dan kelompok 5 ($p=0,028$, $R^2=84,4\%$). Berdasarkan gambar 2, dapat disimpulkan bahwa bertambahnya hari latihan akan mengurangi waktu yang diperlukan untuk mencapai *hidden platform* baik pada kelompok Normal, OVX, OVX+IGD 15, 30, dan 60 mg/kgBB/hr. Model regresi untuk kelompok OVX+IGD 60mg/kgBB/hr memberikan rata-rata waktu yang diperlukan untuk mencapai *hidden platform* terendah jika hari latihan ditambah satu hari dibandingkan kelompok yang lain.



Gb 2. Analisa Regresi Hari terhadap Waktu yang dibutuhkan untuk Mencapai Hidden Platform



Gb. 3 Analisa Regresi Dosis IGD terhadap Waktu yang dibutuhkan untuk Mencapai Hidden

Namun terdapat kecenderungan yang sama pada semua kelompok bahwa grafik menurun tajam sejak tes hari I sampai hari III, dan selanjutnya grafik menurun landai sejak tes hari III sampai hari V. Uji perbandingan berganda LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan pengaruh yang nyata antara kelompok OVX dengan kelompok OVX + IGD dosis 15, 30, dan 60 mg/kgBB/hr terhadap waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform* (p masing-masing = 0,000).

Jika dibandingkan kelandaian grafik antara kelompok normal dengan kelompok OVX tampak bahwa grafik kelompok OVX lebih landai. Ini berarti pengurangan waktu yang dibutuhkan untuk mengingat dari hari ke hari pada kelompok OVX lebih sedikit daripada kelompok normal, artinya telah terjadi penurunan daya ingat pada kelompok OVX dibanding kelompok normal. Namun sebaliknya pada kelompok OVX+IGD dosis 15, 30, dan 60 mg/kgBB/hr kelandaian grafik menyerupai kelompok normal, ini menunjukkan bahwa IGD mengembalikan kemampuan mengingat (memori) tikus hipoestrogen hingga menuju normal.

Data kelompok OVX+IGD 15, 30, dan 60 mg/kgBB/hr menunjukkan bahwa makin tinggi dosis IGD yang diberikan, ada kecenderungan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform* semakin pendek. Uji MANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh yang bermakna antar kelompok OVX+IGD masing-masing dosis terhadap waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform* pada keseluruhan hari dengan p value = 0,007 (Pillai), p = 0,002 (Wilks), p = 0,001 (Hotelling), dan p = 0,000 (Roy). Uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh yang signifikan antar kelompok OVX+IGD masing-masing dosis terhadap waktu yang dibutuhkan tikus untuk mencapai *hidden platform* pada tes hari I (p = 0.041), hari IV (p = 0.006) dan hari V (p = 0.000).

Analisa regresi pada hasil pengamatan hari I s.d hari V menunjukkan bahwa dosis IGD berpengaruh negatif terhadap waktu yang dibutuhkan tikus untuk mencapai *hidden platform*, yang berarti bahwa makin

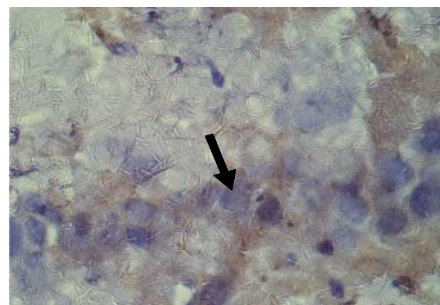
tinggi dosis IGD maka makin sedikit waktu yang dibutuhkan tikus untuk mencapai *hidden platform*. Koefisien regresi pada hari I (p = 0,022, R^2 = 34,2%), hari II (p = 0,103, R^2 = 19,1%), hari III (p = 0,407, R^2 = 5,3%), hari IV (p = 0,018, R^2 = 36%), hari V (p = 0,000, R^2 = 78,7%). Garis regresi tampak pada gambar 3.

Berat Otak Tikus

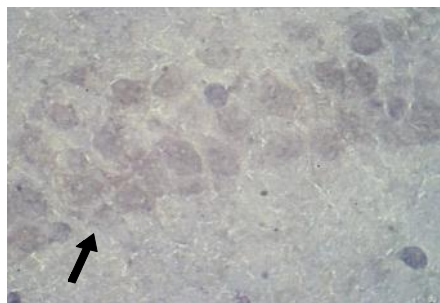
Pengukuran berat otak tikus dilakukan sesaat setelah tikus dibunuh, yaitu pada hari ke-22 setelah dinyatakan hipoestrogen. Hasil pengukuran berat otak tampak pada tabel 2. Data dari tabel 3 menunjukkan bahwa berat otak kelompok OVX tidak berbeda dengan kelompok normal. Demikian pula pada kelompok OVX+IGD tidak menunjukkan adanya perubahan dalam berat otak dibanding dengan kelompok OVX. Uji statistika ANOVA menyimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antar kelompok perlakuan terhadap berat otak tikus (p = 0,936).

Jumlah Sel pyramidal hipokampus CA1 dan Aktivitas Kolinergik di Hippokampus CA1.

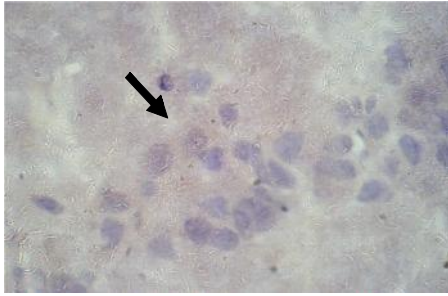
Hasil pengecatan AChE tampak pada gambar 4. Hasil perhitungan jumlah sel piramidal CA1 tampak pada tabel 4. Data tersebut menunjukkan bahwa jumlah sel piramidal kelompok OVX tidak berbeda dengan kelompok normal. Demikian pula jumlah sel piramidal CA1 kelompok OVX+IGD tidak berbeda dengan kelompok OVX. Uji Statistika ANOVA menyimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antara kelompok perlakuan terhadap jumlah sel piramidal CA1 hipokampus dengan p value = 0.961



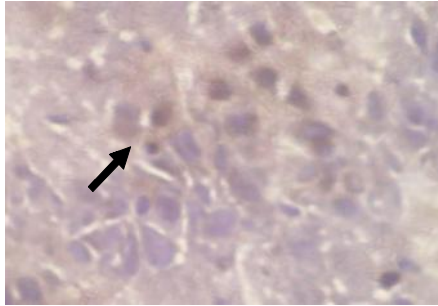
KELOMPOK N



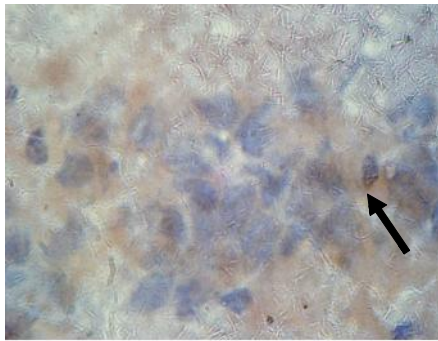
KELOMPOK OVX



KELOMPOK OVX + IGD 15 mg/kgBB/hr



KELOMPOK OVX + IGD 30 mg/kgBB/hr



KELOMPOK OVX + IGD 60 mg/kgBB/hr

Gambar 4. Perubahan Aktivitas Kolinergik di hippocampus dengan pengecatan Asetil Cholinesterase (AChE) setelah pemberian Isoflavon Fitoestrogen dari Ekstrak *Pueraria lobata* pada tikus Hipoestrogen. Dilihat pada pembesaran 1000x. Tanda panah menunjukkan sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE (warna coklat di sekitar sel). Pada kelompok OVX tampak jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE turun dibanding kelompok normal, ini berarti terjadi penurunan aktivitas kolinergik pada kelompok OVX. Aktivitas kolinergik membaik setelah pemberian Isoflavon Fitoestrogen dari Ekstrak *Pueraria lobata*, gambaran paling baik adalah kelompok OVX+IGD 60 mg/kgBB/hr. Fitoestrogen dari Ekstrak *Pueraria lobata* meningkatkan jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE. Terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antar kelompok perlakuan terhadap jumlah sel pyramidal CA1 yang mengekspresi AChE ($p=0,000$).

Tabel 3. Efek Isoflavon Fitoestrogen dari Ekstrak *Pueraria lobata* terhadap Berat Otak Tikus

Perlakuan	Berat Otak (gram)		Analisa
	\bar{X}	SD	
Kontrol N	1,578	± 0,049	*Anova ($p=0,936$)
OVx	1,563	± 0,065	
Ovx + IGD 15mg/kgBB/hr	1,601	± 0,068	
Ovx + IGD 30mg/kgBB/hr	1,580	± 0,086	
Ovx + IGD 60mg/kgBB/hr	1,588	± 0,076	

· Uji statistika Anova terhadap rerata berat otak tikus tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan ($p=0,936$). Nilai ditunjukkan dalam rata-rata ± SD ($n=5$)

Tabel 4. Efek Isoflavon Fitoestrogen dari Ekstrak *Pueraria lobata* terhadap Jumlah Sel Piramidal di CA1 Hippokampus

Perlakuan	Jumlah sel piramidal CA1 Hippokampus (satuan/0.01 mm ²)		Analisa
	\bar{X}	SD	
Kontrol N	42	± 7	*Anova ($p=0,961$)
OVx	40	± 3	
OVx + IGD 15mg/kgBB/hr	43	± 4	
OVx + IGD 30mg/kgBB/hr	41	± 5	
OVx + IGD 60mg/kgBB/hr	42	± 5	

· Uji statistika ANOVA terhadap rerata jumlah sel piramidal di CA1 hippocampus menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan ($p = 0,961$). Nilai ditunjukkan dalam rata-rata ± SD ($n=5$).

Hasil penghitungan terhadap jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE tampak pada tabel 5. Data tersebut menunjukkan bahwa terjadi penurunan yang nyata terhadap jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE pada kelompok OVX dibanding kelompok normal. Uji statistika ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan terhadap jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE ($p=0,000$). Pemberian IGD memperbaiki keadaan tersebut, ini terlihat dari adanya peningkatan jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE pada kelompok OVX+IGD dibanding kelompok OVX. Peningkatan tersebut bahkan melebihi jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE pada kelompok normal. Uji statistika perbandingan berganda LSD antara kelompok OVX dengan kelompok OVX+IGD masing-masing dosis menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna terhadap jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE (p masing-masing $=0,000$).

Data kelompok OVX+IGD 15, 30, dan 60 mg/kgBB/hr menunjukkan bahwa makin tinggi dosis IGD yang diberikan, ada kecenderungan jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE meningkat.

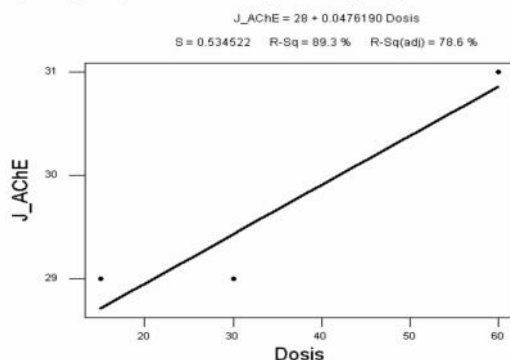
Analisa regresi antara dosis IGD dan jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE (gambar 5) menunjukkan bahwa dosis IGD berpengaruh positif terhadap jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE, yang berarti bahwa makin tinggi dosis IGD yang diberikan, semakin meningkat jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE, meskipun pengaruhnya tidak signifikan ($p=0,212$, $R^2=89,3\%$). Analisa regresi antara jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE dengan waktu (Gambar 6) menunjukkan bahwa jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE berpengaruh negatif secara signifikan terhadap waktu dengan p value = 0.0001 ($R^2=48,4\%$). Artinya bahwa semakin banyak jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE, maka waktu yang diperlukan untuk mencapai *hidden platform* semakin sedikit.

Tabel 5. Efek Fitoestrogen dari Ekstrak *Pueraria lobata* terhadap Jumlah Sel Piramidal CA1 Hippokampus yang mengekspresi AChE

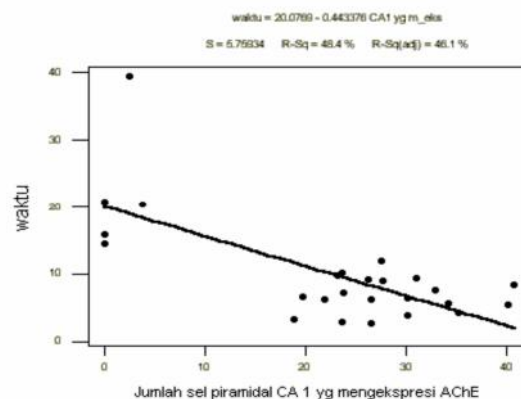
Perlakuan	Jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE (satuan/0.01 mm ²)			Analisa
	\bar{Y}	\pm	SD	
Kontrol N	24	\pm	3	** * Anova ($p=0,000$) ** Perbandingan Berganda LSD
OVx	1	\pm	2	
OVx + IGD 15mg/kgBB/hr	29	\pm	8	
OVx + IGD 30mg/kgBB/hr	29	\pm	5	
OVx + IGD 60mg/kgBB/hr	31	\pm	7	

· Uji Statistika ANOVA terhadap rerata jumlah sel piramidal CA1 hipokampus yang mengekspresi AChE menunjukkan perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan ($p=0,000$)

· Uji Perbandingan Berganda LSD menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok OVX dengan kelompok OVX+IGD dosis 15, 30, dan 60 mg/kgBB/hr, dengan p value masing-masing=0,000



Gb. 5 Analisa regresi antara dosis IGD dengan jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE



Gb. 6 Analisa regresi antara jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE dengan waktu yang diperlukan untuk mencapai *hidden platform* pada hari V kelompok OVX+IGD 15, 30, dan 60 mg/kgBB/hr

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa isoflavon fitoestrogen dari ekstrak *Pueraria lobata* dapat meningkatkan memori tikus hipoeestrogen melalui peningkatan aktivitas kolinergik di hippocampus CA1. Dari studi literatur diketahui bahwa di dalam ekstrak *Pueraria lobata* terkandung beberapa jenis isoflavon, flavonoid, lignan serta flavon-flavon lain (Mazur, 1998). Isoflavon utama yang terdapat di dalam *Pueraria lobata* adalah genistein dan daidzein (Prasain, 2004). Berdasarkan hasil HPLC pada penelitian ini didapatkan bahwa ekstrak *Pueraria lobata* yang berasal dari 300 gram tepung daging dan 75 gram tepung kulit mengandung 28.252,7 ppm total isoflavon genistein daidzein dengan komposisi 5.141,3 ppm genistein dan 23.111,4 ppm daidzein. Ini berarti kadar daidzein dalam ekstrak adalah 4,5 kali kadar genistein.

Isoflavon mempunyai dua gugus OH / hidroksil yang berjarak 11,0 – 11,5 Å pada intinya yang mana hal ini juga dimiliki oleh inti estrogen endogen. Hal ini menyebabkan isoflavon mempunyai afinitas terhadap reseptor estrogen (RE) meskipun afinitas tersebut lebih lemah 1/1000 kali dibanding estradiol. Konsekuensinya, isoflavon dapat memberikan efek estrogenik lemah (Kuiper, 1999) atau dapat bertindak sebagai *selective estrogen receptor modulator* (SERM) dan memberikan efek antiproliferasi (McEwen, 2000). Efek estrogenik yang muncul sangat tergantung pada beberapa faktor, antara lain konsentrasi *isoflavon*, kadar estrogen endogen, dan karakteristik individual seperti jenis kelamin dan status menopause (Quela, 2000 dalam Nedeljkovic, 2001). RE sendiri ada dua tipe yaitu RE- α dan RE- β . Estradiol mempunyai afinitas terhadap RE- α lebih besar daripada terhadap RE- β . Masing-masing RE tersebut memberikan efek yang berbeda jika berikatan dengan estradiol. Estradiol yang berinteraksi dengan RE- α melalui *AP1 transcription*

factor akan menyebabkan aktivasi transkripsi, sebaliknya jika estradiol berinteraksi dengan RE- β akan menghambat transkripsi. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivasi RE- β akan menghambat proliferasi seluler. Isoflavon secara invitro berkompetisi dengan estradiol dalam berinteraksi dengan RE. Tetapi secara invivo, isoflavon diketahui mempunyai affinitas terhadap RE- β lebih besar daripada terhadap RE- α . Itulah sebabnya isoflavon dapat memberikan efek antiproliferasi melalui ikatannya dengan RE- β (Kuiper, 1997). Besarnya affinitas masing-masing jenis isoflavon terhadap RE- β juga bervariasi. Genistein mempunyai affinitas 10 kali lebih besar terhadap RE- β dibanding daidzein (Kuiper, 1998).

Pada penelitian ini pemberian ekstrak *Pueraria lobata* dilakukan secara per sonde. Di usus halus daidzein akan mengalami metabolisme oleh mikroba usus menghasilkan metabolit aktif yang disebut equol. Secara invitro diketahui bahwa equol mempunyai affinitas terhadap RE- α lebih besar dibanding jenis isoflavon yang lain (Kuiper, 1997; Picherit, 2000). Pelissero (1991) menyebutkan bahwa pada ikan, equol 10-100 kali lebih estrogenik dibanding daidzein dan minimal 10 kali lebih estrogenik dibanding genistein. Berdasarkan besarnya komposisi daidzein di dalam ekstrak *Pueraria lobata*, adanya metabolisme daidzein menjadi equol oleh mikroba usus serta besarnya affinitas equol terhadap RE- α dibandingkan genistein maupun daidzein, maka dapat diduga bahwa yang dominan menimbulkan efek pada penelitian ini adalah equol. Namun harus diingat bahwa isoflavon yang terkandung dalam *Pueraria lobata* tidak hanya genistein dan daidzein, masih terdapat isoflavon lain yang belum teridentifikasi. Di samping itu isoflavon bukanlah satu-satunya senyawa yang ada dalam *Pueraria lobata*, masih terdapat flavon, flavonoid ataupun senyawa lain yang belum teridentifikasi. Tidak menutup kemungkinan senyawa-senyawa yang belum teridentifikasi tersebut mempunyai efek sinergis terhadap genistein / daidzein, atau bahkan memiliki peran yang lebih dominan daripada genistein / daidzein.

Untuk mengetahui efek estrogenik isoflavon fitoestrogen dari ekstrak *Pueraria lobata* pada fungsi memori maka digunakan tikus yang dibuat keadaannya hipoestrogen melalui ooforektomi (OVX). Tikus OVX sering dipakai sebagai model tikus hipoestrogen (Lephart, 2000). Perubahan yang timbul pada fungsi memori akibat ooforektomi dalam penelitian ini tidak sama dengan akibat proses penuaan, karena ooforektomi pada penelitian ini dilakukan pada tikus dewasa dimana fungsi dan struktur jaringan yang terkait fungsi memori masih normal. Hasilnya akan berbeda jika ooforektomi dilakukan pada tikus tua.

Hasil studi pendahuluan (tabel 1) menunjukkan bahwa OVX yang dilakukan menurut metode Ingle dan Griffith (1971) telah menghasilkan keadaan hipoestrogen

dengan bukti berupa turunnya kadar estradiol, uterus atropi, dan gambaran smear vagina didominasi epitel parabasal dan intermedier (seperti gambaran fase diestrus) (David, 2001). Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa 2 minggu paska OVX yang dilakukan dengan metode Ingle dan Griffith (1979) mampu membuat tikus berada dalam keadaan hipoestrogen. Kesimpulan ini sesuai dengan apa yang pernah diungkapkan oleh David (2001) bahwa penurunan estrogen nyata setelah hari ke-14 paska OVX.

Tes MWM merupakan tes untuk mengukur kemampuan memori visual ruang. Seperti diketahui bahwa penurunan memori mula-mula terjadi pada memori deklaratif episodik, yaitu memori yang berkaitan dengan waktu dan tempat (Kusumoputro, 1999 dalam Asril, 2001). Pada tes ini tikus dilatih untuk menyelesaikan tugas sederhana. Tikus dimasukkan ke dalam kolam berisi air, secara otomatis ia akan berenang sampai menemukan tempat untuk berpijak (*hidden platform*). Dengan pengulangan, tikus segera belajar untuk mengingat posisi *hidden platform*, sehingga pada latihan berikutnya ia bisa mencapai tempat tersebut dalam waktu lebih cepat dari sebelumnya. Semakin sering tes (latihan) dilakukan maka waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform* semakin sedikit. Tikus melakukan hal tersebut dengan bantuan tanda-tanda visual yang ada di sekeliling kolam. Tikus yang mengalami kerusakan / disfungsi hippocampus tidak akan mampu melakukan hal tersebut, meskipun ia pernah dilatih sebelum hippocampusnya rusak (Noonan, 1996). Telah diketahui bahwa hippocampus berperan penting pada proses penyimpanan informasi (*storage*) maupun pemanggilan kembali informasi (*recall*) (Strub dan Black, 1985). Data pada gambar 17 menunjukkan bahwa ada kecenderungan yang sama pada semua kelompok bahwa waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform* sejak pengamatan hari I sampai dengan hari V makin menurun, meskipun besarnya penurunan tersebut tidak sama. Hal ini berarti tahapan dan proses pembentukan memori yang dilalui masing-masing kelompok hampir sama. Fakta ini sesuai dengan teori *Long-Term Potentiation* (LTP) yang pernah dikemukakan oleh Bliss & Lomo (1973) yaitu meningkatnya sensitivitas sinap akibat stimuli yang berulang, sehingga dengan kadar stimuli yang sama akan menghasilkan *output* di post sinap yang lebih besar. Stimulasi pada sel piramidal CA1 akan mengakibatkan terjadinya depolarisasi dan selanjutnya akan mengaktifasi reseptor NMDA. Aktivasi reseptor NMDA menyebabkan terbukanya kanal kalsium. Kalsium yang masuk ke dalam neuron akan mengikat kalmodulin, dan selanjutnya mengaktifasi enzim CaMKII. Aktivasi enzim CaMKII menyebabkan fosforilasi reseptor AMPA sehingga permeabilitas neuron terhadap ion natrium meningkat. Masuknya ion natrium menyebabkan potensial istirahat turun dan sel menjadi lebih sensitif. Selain itu pada saat

terjadinya LTP secara bersamaan juga terjadi peningkatan sintesa protein dan pembentukan sinap baru. LTP ini merupakan basis mekanisme seluler dan molekuler proses pembentukan memori (Amaral, 1997). Dari penelitian-penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa estrogen berperan dalam meningkatkan LTP di hippocampus (Foy, 2001)

Gambar 1 menunjukkan bahwa grafik kelompok OVX lebih landai dibanding kelompok normal dan jika dilihat dari besarnya pengurangan waktu yang dibutuhkan untuk mengingat dari hari ke hari, dimana hal ini erat hubungannya dengan peningkatan kemampuan tikus mengingat dari hari ke hari, tampak bahwa peningkatan kemampuan mengingat tikus OVX dari hari ke hari lebih rendah daripada tikus normal. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tindakan OVX yang menyebabkan keadaan hipoestrogen pada tikus, secara signifikan menurunkan fungsi memori ($p=0,000$). Hal ini dapat dipahami bahwa keadaan hipoestrogen mempengaruhi proses pembentukan memori melalui penurunan LTP di hippocampus.

Hasil tes MWM menunjukkan bahwa pemberian IGD dari ekstrak *Pueraria lobata* dapat memperbaiki fungsi memori tikus hipoestrogen. Pada gambar 17 tampak bahwa kemampuan mengingat tikus OVX yang diberi IGD lebih tinggi dibanding tikus OVX dan jika dilihat dari pengurangan waktu yang dibutuhkan untuk mengingat tikus dari hari ke hari, tampak bahwa peningkatan kemampuan mengingat tikus OVX+IGD dari hari ke hari lebih tinggi dibanding tikus OVX ($p<0,05$). Jika dibandingkan dengan tikus normal tampak bahwa fungsi memori pada tikus OVX+IGD tidak berbeda nyata sejak hari I sampai dengan hari V ($p>0,05$). Demikian pula dalam hal peningkatan kemampuan mengingat dari hari ke hari antara tikus OVX+IGD dengan tikus normal terdapat kecenderungan yang sama. Pada tikus normal, peningkatan kemampuan mengingat bermakna sejak hari I s.d hari IV, sedangkan peningkatan hari IV menuju hari V tidak bermakna. Ini menunjukkan bahwa kemampuan mengingat tikus sudah maksimal pada hari IV. Pada tikus OVX+IGD dosis 15, 30 maupun 60 mg/kgBB/hr peningkatan kemampuan mengingat tikus pada hari IV menuju hari V masih bermakna, mungkin jika hari pengamatan ditambah peningkatan memori masih terjadi setelah hari V dan ini bisa berarti fungsi memori pada kelompok OVX+IGD lebih baik dibanding kelompok normal. Bukti adanya perbaikan memori pada tikus OVX setelah pemberian IGD diperkuat juga oleh hasil analisa regresi yang menunjukkan bahwa dosis IGD berpengaruh negatif terhadap waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform* (gambar 20) yang berarti bahwa makin tinggi dosis IGD yang diberikan maka makin baik fungsi memorinya. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Lund et al. (2001)

bahwa pemberian diet soy fitoestrogen pada tikus betina dapat meningkatkan memori visual ruang.

Berdasarkan modalitas sensori yang menerima respon, memori dapat diklasifikasikan menjadi memori visual, memori auditory, dan memori taktil. Perbaikan satu jenis memori tidak selalu diikuti oleh perbaikan jenis memori yang lain. Hal ini disebabkan karena banyak faktor yang mempengaruhi memori, antara lain atensi / perhatian, proses belajar, fungsi organ sensoris penerima dan koordinasi motor (Strub dan Black, 1985). Jadi perbaikan pada fungsi memori visual belum tentu diikuti oleh perbaikan pada memori auditory ataupun taktil.

Data dari tabel 5 menunjukkan bahwa OVX secara bermakna menurunkan jumlah sel piramidal CA1 hippocampus yang mengekspresi AChE ($p=0,000$). Regresi antara jumlah sel piramidal CA1 hippocampus yang mengekspresi AChE dengan fungsi memori (dalam hal ini yang diukur adalah waktu yang dibutuhkan untuk mencapai *hidden platform*) (gambar 6) menunjukkan bahwa ada kecenderungan semakin banyak jumlah sel piramidal CA1 hippocampus yang mengekspresi AChE maka fungsi memori semakin baik ($R^2=48,4\%$, $p = 0,0001$). Ini berarti aktifitas kolinergik di CA1 hippocampus berkorelasi positif terhadap fungsi memori tikus. Dari fakta di atas dapat ditarik kesimpulan bahwa ada hubungan antara penurunan fungsi memori tikus OVX dengan penurunan aktivitas kolinergik di CA1 hippocampus. Kesimpulan di atas sejalan dengan teori yang menyatakan bahwa penurunan estrogen menyebabkan peran estrogen dalam menginduksi choline acetyltransferase (ChAT) di *basal forebrain* dan hippocampus turun. Penurunan aktivitas ChAT di hippocampus menyebabkan produksi asetilkolin (ACh) di hippocampus turun, hal ini bisa ditandai dengan turunnya beberapa marker kolinergik, antara lain kadar AChE (Gibbs et al. 1997 dalam Jellinger, 2001). Demikian pula halnya di *basal forebrain*, penurunan aktivitas ChAT menyebabkan produksi ACh di *basal forebrain* turun (Shi et al. 1998 dalam Jellinger, 2001). Telah diketahui bahwa *basal forebrain* merupakan pemasok jalur kolinergik utama yang menuju hippocampus, sehingga pada akhirnya ACh yang ditransmisikan ke hippocampus juga berkurang (Kandell, 2000). Penelitian-penelitian terdahulu sudah membuktikan mekanisme kerja estrogen dalam fungsi memori salah satunya adalah melalui sistem kolinergik antara lain di *basal forebrain*, estrogen berfungsi menginduksi ChAT, mencegah penurunan afinitas up-take choline dan aktifitas ChAT di frontal korteks dan hippocampus (McEwen, 2001), mempengaruhi transportasi faktor neurotropin (NGF, BDNF) yang berfungsi sebagai regulator sistem kolinergik dari hippocampus ke neuron *basal forebrain* (Gibbs et al. 2000 dalam Jellinger, 2001). Di hippocampus estrogen mempengaruhi produksi faktor neurotropin, meningkatkan densitas dendrit spine di CA1 neuron piramidal, menginduksi pembentukan sinap

baru pada *spine* di CA1 (McEwen, 1992), meregulasi densitas *dendritic spine* dan jumlah sinap pada reseptor NMDA di CA1 (Adams, 2001), meningkatkan utilisasi glukosa oleh sel otak, sehingga sintesa asetil kolin dari kolin dan asetil koA oleh enzim ChAT meningkat.

Data dari tabel 3 dan 4 menunjukkan bahwa OVX tidak mempengaruhi berat otak dan jumlah sel piramidal hipokampus CA1. Ini berarti penurunan aktivitas kolinergik di hipokampus CA1 semata-mata disebabkan oleh menurunnya fungsi neuron kolinergik di CA1 dan tidak disebabkan oleh adanya perubahan pada struktur neuron kolinergik hipokampus CA1 maupun struktur sel otak secara umum.

Adanya perbaikan memori pada tikus OVX setelah pemberian IGD tampaknya berhubungan dengan aktivitas kolinergik di CA1 hipokampus. Tabel 5 menunjukkan bahwa pemberian IGD masing-masing dosis telah mengembalikan fungsi sel kolinergik di CA1 hipokampus tikus OVX menuju normal, yang ditandai dengan meningkatnya jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE pada tikus OVX + IGD dibanding tikus OVX (p masing-masing=0,000). Analisa regresi juga menunjukkan bahwa dosis IGD berpengaruh positif terhadap jumlah sel piramidal CA1 yang mengekspresi AChE (gambar 5) dalam arti makin tinggi dosis IGD yang diberikan maka ada kecenderungan aktivitas kolinergik di CA1 hipokampus juga makin meningkat, meskipun pengaruhnya tidak signifikan ($R^2=89,3\%$, $p=0,212$). Pengaruh yang tidak signifikan ini mungkin disebabkan karena jumlah sampel (n) yang dipakai kecil. Hasil tersebut tampaknya mendukung penelitian terdahulu, bahwa pemberian diet soy bean selama 8 minggu pada tikus pasca ooforektomi dapat meningkatkan aktifitas kolinergik di korteks dan hipokampus yang ditandai dengan peningkatan kadar ChAT (Pan et al. 1999).

Pada sistem memori isoflavon bekerja dengan dua mekanisme, yaitu mekanisme yang melalui RE (*receptor-dependent*) dan mekanisme yang tidak melalui RE (*receptor-independent*). Mekanisme *Receptor-dependent* sendiri terbagi lagi menjadi dua, yaitu isoflavon secara langsung berikatan dengan RE (*Direct Receptor-dependent*) dan menimbulkan efek seperti efek estrogen endogen (McEwen, 2000) dan yang secara tidak langsung (*Indirect Receptor-dependent*), yaitu dengan cara mempengaruhi kadar estrogen endogen dalam sirkulasi. Yang termasuk *Indirect Receptor-dependent* antara lain genistein menghambat enzim sitokrom P450 CYP1A1 yang berfungsi memetabolisme 17β -estradiol, sehingga jika enzim tersebut dihambat maka kadar estradiol yang beredar di sirkulasi akan meningkat dan selanjutnya aktivitas RE juga akan meningkat (Shertzer et al. 1999). Isoflavon *pueraria* (*daidzein*) dapat meningkatkan kadar estrogen hingga mencapai kadar normal pada tikus OVX melalui peningkatan gonadotropin-releasing hormone (GnRH)

(BL Qi, 2002). Genistein menghambat enzim 17α -hidroksisteroid oksidoreduktase tipe-1 (HSOR-1) sehingga menurunkan produksi estrogen dari jaringan perifer, akibatnya total estrogen dalam sirkulasi turun (Makela, 1998 dalam Bouker dan Clarke, 2000). Genistein meningkatkan sintesa Sex-Hormone Binding Globulin (SHBG), akibatnya makin banyak estrogen yang terikat dengan globulin dan makin sedikit estrogen yang bebas (Baker, 1998 dalam Bouker dan Clarke, 2000). Mekanisme yang mempengaruhi kadar estrogen endogen dalam sirkulasi di atas tampak saling bertolak belakang, tidak jelas efek akhir genistein terhadap keseluruhan efek estrogenisasi. Kemampuan genistein menghambat enzim CYP1A1 ataupun HSOR-1 mungkin melalui HPA axis yang menyebabkan upregulasi satu atau lebih enzim-enzim tersebut.

Mekanisme isoflavon yang kedua adalah mekanisme yang tidak melalui RE (*receptor-independent*). Suatu hasil penelitian pernah diungkapkan oleh O'Dell dkk (1991) bahwa pemberian genistein yang diinjeksikan ke postsinap sel secara selektif dapat menghambat induksi LTP di hipokampus, sehingga dapat mengganggu proses pembentukan memori di CA1. Hal ini disebabkan karena genistein merupakan tirosin kinase inhibitor, padahal aktivitas tirosin kinase dibutuhkan di postsinap dalam proses LTP. Pernyataan O'Dell tersebut tidak terbukti pada penelitian ini, hal ini mungkin disebabkan karena tikus yang dipakai pada penelitian ini adalah tikus dewasa (belum mengalami proses menua) yang dibuat keadaannya menjadi hipoestrogen secara artifisial, sedang tikus yang dipakai O'Dell adalah tikus tua. Telah diketahui bahwa kemampuan plastisitas hipokampus (LTP) amat tergantung pada usia, semakin tua kemampuan plastisitas menurun (Adams et al. 2001).

Melalui mekanisme *receptor-dependent*, isoflavon akan berinteraksi dengan RE- α . Aktivasi RE- α akan memodulasi RE- α , selanjutnya akan menimbulkan efek seperti efek estrogen endogen. Estrogen menimbulkan efek melalui 2 mekanisme, yaitu pertama mekanisme yang melalui RE intraseluler (mekanisme genomik). Mekanisme ini merupakan mekanisme utama estrogen di otak dan mekanisme kedua adalah mekanisme non genomik, yaitu aksi cepat estrogen dalam mempengaruhi eksitabilitas neuron yaitu dengan melibatkan modulasi kopling protein G, mempengaruhi terbukanya kanal kalsium dan masuknya ion kalsium, serta mempengaruhi pelepasan hormon GnRH (Brinton, 2001).

Distribusi RE- α dan RE- β dalam organ-organ tubuh sangat bervariasi. Di otak, khususnya di hipokampus ekspresi RE- β lebih banyak daripada RE- α meskipun RE- α dan RE- β sama-sama terekspresi di sana (Kuiper, 1998). Regulasi fungsi memori termasuk sistem kolinergik adalah melalui RE- α (McEwen, 2001), sedang RE- β berfungsi memodulasi aktivitas RE- α . Hal

ini menarik karena isoflavon mempunyai affinitas terhadap RE- β lebih besar dibanding terhadap RE- α

Pengaruh estrogen terhadap fungsi memori tidak hanya melalui sistem kolinergik, beberapa neurotransmitter lain juga ikut berperan antara lain epinephrin, GABA, serotonin, dopamin, dan glutamat. Beberapa studi terdahulu sudah membuktikan bahwa estrogen ikut berperan dalam regulasi neurotransmitter-neurotransmitter tersebut. Estradiol ikut berperan dalam regulasi epinephrin. Peningkatan kadar epinephrin di hippocampus berperan dalam proses LTP (Ahmadias, 2003). Estradiol meningkatkan up-take dopamin pada sel hippocampus (Christian & Gills, 1999 dalam Liporace, 2001). Estradiol menurunkan densitas innervasi serotonin (5-HT) di stratum lanukosum molekulare dan radiatum CA1 hippocampus. 5-HT diketahui menghambat theta rhythm di hippocampus yang penting dalam proses LTP (Prangekiel et al. 2004). Estradiol menginduksi transport glutamat dari sel astrosit, estrogen ikut berperan dalam regulasi transmisi glutamatergik. Glutamat diketahui bersifat neurotoksik (Liang, et al. 2002 dalam Doraiswamy, 2002). Pengaruh isoflavon terhadap memori tidak menutup kemungkinan juga melalui neurotransmitter-neurotransmitter tersebut, sehingga perlu dilakukan studi lebih lanjut.

Pengaruh estrogen terhadap fungsi memori tidak hanya melalui sistem neurotransmitter, beberapa mekanisme lain juga ikut berperan antara lain estrogen meningkatkan densitas spine dendrit di sel piramidal CA1 dan meningkatkan jumlah sinap spinal (Murphy, 1998), sehingga meningkatkan eksitabilitas hippocampus. Meningkatnya plastisitas sinap ini terjadi melalui aktivitas reseptor IGF-1 (Foy, 1999).

Meskipun fitoestrogen 1000-10000 kali kurang estrogenik dibanding 17 β -estradiol, pada orang-orang Jepang yang mempunyai kebiasaan mengkonsumsi fitoestrogen, kadarnya dalam darah cukup tinggi hingga mencapai 1000 kali lebih tinggi dibanding kadar tertinggi estradiol pada wanita premenopause (Adlercreutz, 1998). Kadar yang tinggi ini akan mengkompensasi kelemahannya sehingga menimbulkan efek yang adekuat (Hidayat, 2002). Dari fakta di atas tampak bahwa fitoestrogen dapat terakumulasi dalam tubuh, sehingga pemberian fitoestrogen pada penyakit Alzheimer lebih efektif jika diberikan sebagai preventif. Selain atas pertimbangan efek akumulasi fitoestrogen, perbaikan memori akan lebih tampak jika neuron-neuron yang mengatur sistem memori hanya mengalami penurunan fungsi sel dan belum mengalami kerusakan struktur akibat proses degenerasi. Hal ini sejalan dengan penelitian yang pernah dilakukan Mulnard et al. (2000) bahwa estrogen dapat memperbaiki fungsi memori pada penderita Alzheimer ringan sampai sedang, dan tidak pada penderita Alzheimer yang berat.

Bertolak dari fakta di atas dan didukung oleh kajian teori-teori, maka dapat disimpulkan bahwa isoflavon

dari ekstrak *Pueraria lobata* dapat meningkatkan fungsi memori, dan diduga peningkatan fungsi memori tersebut salah satunya melalui peningkatan aktivitas kolinergik di CA1 hippocampus.

Pemakaian fitoestrogen *Pueraria lobata* untuk mencegah gangguan memori pada manusia masih memerlukan kajian dan penelitian lebih lanjut, terutama mengenai dosis terapi yang aman serta efeknya pada pemakaian jangka panjang mengingat ia bisa terakumulasi dalam tubuh. Pada penelitian ini pemberian isoflavon fitoestrogen 60 mg/kg/hr terbukti dapat memperbaiki memori secara bermakna, tetapi pada saat yang sama terjadi kecenderungan ke arah hiperplasi pada uterus tikus (Anita, 2005). Pada tikus, transpor isoflavon melalui blood brain barrier relative tidak efisien. Hal ini dibuktikan oleh Lephart et al. (2000) bahwa pada tikus dewasa yang diberi diet isoflavon 600 μ g/gr diet, kadar isoflavon dalam plasma tikus adalah 36 kali kadarnya di otak. Penentuan dosis isoflavon untuk perbaikan memori perlu memperhitungkan berapa kadar yang sampai di otak. Untuk itu perlu dilakukan uji toksisitas umum maupun toksisitas khusus, terutama uji karsinogenisiti.

Kesimpulan

1. Ekstrak *Pueraria lobata* mengandung fitoestrogen isoflavon berkhasiat meningkatkan fungsi memori dan diduga salah satunya melalui peningkatan aktivitas kolinergik di hippocampus CA1.
2. Kandungan utama isoflavon dari ekstrak *Pueraria lobata* yang diduga menjadi bahan aktif adalah genistein dan daizein.

Saran

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek isoflavon fitoestrogen dari ekstrak *Pueraria lobata* terhadap jenis memori yang lain antara lain memori *auditory* dan *tactil*.
- b. Untuk mengetahui adakah bahan aktif lain yang terkandung dalam *Pueraria lobata*, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang mengidentifikasi jenis-jenis isoflavon, flavonoid ataupun senyawa lain.
- c. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah efek pemberian isoflavon fitoestrogen dari ekstrak *Pueraria lobata* terhadap memori juga terjadi melalui sistem neurotransmitter yang lain atau melalui mekanisme lain yang tidak berhubungan dengan neurotransmitter.
- d. Perlu kajian dan penelitian lebih lanjut mengenai dosis terapi yang efektif dan aman untuk memperbaiki memori.
- e. Perlu dilakukan uji toksisitas umum maupun uji toksisitas khusus, yaitu uji karsinogenisiti mengingat pada pemberian IGD dosis besar telah menyebabkan adanya kecenderungan ke arah hiperplasi pada uterus tikus

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, MM., Shah, RA., Janssen, WGM., Morrison JH, 2001, Different Modes of Hippocampal Plasticity in Response to Estrogen in Young and Aged Female Rats, *PNAS* **98** (14) : 8071-8076
- Ahmadiasl N, Alaci H, Hänninen O, 2003, Effect of Exercise on Learning, memory, and Level of Epinephrine in Rat's Hippokampus, *J. Sports Science & Medicine* **2** : 106-109
- Adlercreutz, H, 1998, Phytoestrogens, *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol **12** / number 4, Desember 1998, Bailliere Tindall, London
- Ali M, Hidajat A, Kumalaningsih S, Priyoutomo E, 2003, Bahan dan Metode untuk Mendapatkan Fitoestrogen, Kantor Sentral HAKI Universitas Brawijaya Malang
- Anita, KW, 2005, Efek Fitoestrogen Isoflavon dari ekstrak Pueraria lobata terhadap ekspresi reseptor estrogen β uterus tikus hipoestrogen, tesis, Program Paskasarjana Universitas Brawijaya Malang
- Asril J, 2001, Identifikasi Gangguan Kognitif Ringan pada Usia Pertengahan dengan Cognitive Screening Instrument., Universitas Hassanudin Makassar
- Asthana S, Baker LD, et al, 2001, Highdose estradiol improves cognition for women with AD. Result of a randomized study. *Neurology* ;**57**:605-12
- Biro Pusat Statistik, 1997, Proyeksi Penduduk Indonesia, Jakarta
- BL Qi, BM Qi , 2002, Effect of Purariae-isoflavones on Estrogen Level in Normal and Ovariectomized Rats, *Abstrct Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **27** (11) : 850-2
- Bouker KB., Clarke LH., 2000, Genisatein: Does It Prevent or Promote Breast Cancer?, *Environmental Health Perspectives* **108** (8): 701-707.
- Dalhar, Moch., 2000, Penatalaksanaan Dimensia Presenilis, disampaikan dalam Simposium Gerontologi I, hal 39-73, Malang
- David et al, 2001, Ovarian Hormones Modulate endothelin-1 Vascular reactivity and mRNA xpression in DOCA-Salt Hypertensive Rats, *Hipertension J* **38**:692
- Delis DC, Lucas JA, 1996. Memory in Older Women, Fogel BS, Schiffer RB, Rao SM (ed.) Neuropsychiatry, 2nd edition, William and Wilkins pub, New York.p. 365-399.
- Doraiswamy PM, 2002, Non-Cholinergic Strategies for Treating and Preventing Alzheimer's Disease, *CNS Drug* **16** (12): 811-824
- Duffy R, File S, Wiseman H, 2001, A Soy Isoflavone Supplement Improves Memory in Post-menopausal Women
- Evans DA, 1990, Estimated Prevalence of Alzheimer's disease in the United States, *Milbank Q* **68** : 267-289
- Figallo VB, Lin F, Kenworthy WJ, Giusti MM, 2002, The Effect of Extraction Solvent on the Qualitative and Quantitative Recovery of Isoflavones from Soybean (Glycine max) Cultivars
- Foy, M.R., Xu,J., Xie, X., Brinton, R.D, 1999, 17 β -Estradiol enhances NMDA receptor-mediaed EPSPs and long-term potentiation, *J. Neurophysiol* **81**: 925-929.
- Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA and Ray J, 1988, Multipotent progenitor cells in the adult dentaate gyrus, *J. Neurobiology* **36**; 249-266
- Gibbs RR, Hashash A, Johnson PA, 1997, Effects of Estrogen on Potassium-stimulated Acetylcholine Release in The Hippokampus and Overlying Cortex in Adult Rats, *J. BrainRes*; **749**; 143-146
- Gibbs RB, 2000, Long-term Treatment with estrogen and Progesteron enhances Acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats, *Neurobiol Aging* **21** : 107-116
- Good m, Day M, Muir JI, 1999, Cyclical changes in endogenous level of estrogen modulate the iinduction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region, *J. Neuroscience* , **11**, 4476-4480
- Hoffman BB, Lefkowitz RJ, Taylor P, 1996, Neurotransmission, The Autonomic and Somatic Motor Nervous System; in Goodman & Gilman's The Pharmacology : Basic of Therapeutics, Chapter 6, 9th edition, McGraw-Hill, New York, p. 105-139
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger JC, 2002, Production and Actions of Estrogen, *NEJM* **346** (8):340
- Guela C, and Mesulam MM, 1996, Systematic Regional Variations in The Loss of Cortical Fibers in alzheimer's disease, *Cereb. Cortex* **6**: 165-177
- Hall JM, McDonnell DP, 1999, The ER- β of The Human ER Modulates ER- α Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens, *J. Endocrinology* **140**: 5566-78
- Hall RH, *Contextual Memory*
http://web.umr.edu/~rhall/neuroscience/06_complex_learning/contextual.pdf
- Hasselmo and Schnell, 1994 Modelling The Function of Hippocampal subregion CA1, *J. Neuroscience* **14** (6): 3898-3914
- Harborne JB, 1987, Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, penerjemah : Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerbit ITB, Bandung
- Henderson VW, Paganini-Hill A, Miller BL, et al, 2000, Estrogen for Alzheimer's disease in Women.

- Randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Neurology*; **54**; 295-301
- Heyne, K., 1987, Tumbuhan Berguna Indonesia II, penerjemah : Badan Litbang Kehutanan, Departemen Kehutanan, Jakarta, hal 1040-1041
- Hidajat A., Ali M, Kumalaningsih S, Priyoutomo E, 2003, Identifikasi dan Isolasi Isoflavon Non Kedele Tumbuhan Polong, Simposium Nasional Persatuan Menopause Indonesia dan Asia Pasifik, Menopause Federation, Jakarta.
- HL Petri & MM Mishkin, 1994, Cognitive Memory System, *Behaviorism, Cognivism and the Neuropsychology of Memory American Scientist*, vol. **82**, 30-37.
- Ikonen S, 2001. The Role of The Septohippocampal Cholinergic System in Cognitive Function, doctoral dissertation, Department of Neuroscience and Neurology University of Kuopio
- Jellinger KA, 2001, *Menopause Andropause: Neuroendocrine Changes and Alzheimer's Disease in Postmenopausal Women*
- Kandell ER, Schwartz JH, Jessell TM, 2000, Principles of Neural Science : Learning and Memory, 4th ed, McGraw Hill, p. 1227-1277
- Kaplan dan Saddock, 1991, Synopsis of Psychaitry : Contribution of Psychosocial Sciences of Human Behavior. 6te ed, Baltimore : William and Wilkins, 31-114
- King RA, 2002, Soy Isoflavones in Foods : Processing Effects and Metabolism, *ASA Technical Bulletin* vol. **HN36**
- Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton CJ, Safe SH, Gustafsson J, 1998, Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrgens with ER- β , *J. Endocrinology* vol. **139**, No. 10: 4252-63
- Kusumoputro, 1999, Permasalahan Kontinum Forgetful-Mild Cognitive Impairment – Demensia Alzheimer. Simposium Permasalahan Kontinum Forgetfulness – Mild Cognitive Impairment – Dementia (Alzheimer). Surabaya 1-7
- Leung AY, Foster S, 1996, Encyclopedia of Common Natural Ingredient Used in Food, Drugs, and Cosmetics, 2nd ed, New York
- Liporace j, Pineda CC, Wasserman N, 2002, Neurologic Consideration in the Postmenopausal Woman in Clinical Neurology of the Older Adult, ed. Sirven JJ, Malamut BL, Lipincolt William & Wilkins
- Lovinger M David, 1997, Serotonin's Role in Alcohol's Effects on The Brain, *Alcohol Health & Research World* vol **21**, No 2, 114-119
- Luine, VN., Jacome, LF, MacLusky, N.K., 2003, Rapid Enhancement of Visual and Place Memory by Estrogens in Rats. *Endocrinology*, **144**, 2836-2844.
- Lumempouw, 2000. Aspek Kognitif pada Demensia . Pertemuan Penyusunan Pedoman Pengenalan Dini Demensia, Jakarta 1-6
- Lund TD, West TW, Tian LY, Bu LH, Simmons DL, Setchell KDR, Adlercreutz H dan Lephart ED, 2001, Visual Spatial Memory is Enhanced in Female Rats (but Inhibited in Males) by Dietary Soy Phytoestrogens, *BMC Neuroscience* **2**:20
- Mazur W, 1998, Phytoestrogens in Food. In Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism : Phytoestrogens, vol 12 / number 4, Desember 1998, Bailliere Tindall, London
- McEwen BS, 1999, Clinical Review 108 : The Mollecular and Neuroanatomical Basis for Estrogen Effects in The Central Nervous System, *J. Clin. Endocrinology & Metab* Vol. **84**, No. 6 : 1790-1797
- McEwen BS, 2001, Genome and Hormones : Gender Differences in Physiology Invited Review : Estrogen Effects on the Brain : Multiple Sites and Molecular Mechanism, *J. Appl Physiol* **91** : 2785-2801
- McEwen BS, 2002, Estrogen Actions Throughtout the Brain, *The Endocrine Society*
- MM Miller, SM Hyder, R Assayag, 1999, Estrogen Modulates Spontaneous alteration and The Cholinergic Phenotype in The Basal Forebrain, *Neuroscience*, **91**(3), 1143-53, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.
- Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, et al, 2000, Estrogen Replacement Therapy for Treatment of Mild to Moderate Alzheimer's disease Cooperative Study, *JAMA* ;**283**; 1007-15
- Munoz G. David, Feldman H, 2000, Causes of Alzheimer Disease, *CMAJ* ; **162** (1) : 65-72
- Murkies, Alice, et al, 1998, Phytoestrogens, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. **83**, No 2, p 297-303
- Murphy, D.D & Segal, M., 1996, Regulation of Dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J. Neurosci*, **16**, 4059-4068
- Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K, 1999, Hot flushes and other menopausal symptoms in relation to soy product intake in Japanese woman. *Climacteric* **2**: 6-12
- Nilsson S, Gustafsson JA, 2000, *ER Transcription and Transactivation Basic Aspects of Estrogen Action*, *Breast Ca Res* **2**: 360-366
- Noonan M, Penque M, Axelrod S, 1996, Septal Lesions Impair Rat's Morris Test Performance but Facilitate Left-Right Response Differentiation, *Physiology and Behaviour* **60** : 895-900
- Osburn, Jennifer, 2002, Estrogen Replacement Therapy in The Treatment of Alzheimer's Disease, *Int. Journal of Pharmaceutical Compounding*, Vol **6** No.3, May/June
- O'Dell, ER Kandell, SG Grant, 1991, LTP in the Hippokampus is Blocked by Tyrosine kinase inhibitors, *Nature* Oct **10** 353:6344 558-60

- Ott A, Breteler MMB, Vanharskamp F, Hofman A, 1998, *Incidence and Risk of Dementia-Rotterdam Study*, *Am J Epidemiol* **147**:574-80
- Pangastuti, E.H., 2002, Analisa Komposisi Isoflavon dalam Daging dan Kulit Umbi Tebi (*Pueraria lobata*) dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Skripsi, MIPA Kimia Universitas Brawijaya Malang
- Pan Y, Anthony M, Clarkson TB, 1999, Effects of Estradiol and Soy Phytoestrogens on Choline Acetyltransferase and Nerve Growth Factor mRNAs in the Frontal Cortex and Hippokampus of Female Rats, *Proc Soc Exp Biol Med* **221** L: 118-125
- Pawitan JA, 2001, The Use of Phytoestrogens in Postmenopausal Woman, *The Journal of the Indonesian Medical Association* **II**(VI) November: 1-6
- Paxinos, G., Watson, C., The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 1985, 2nd edition, Academic Press, San Diego, California.
- Prengel-Kiel J, Rune GM, Leranth C, 2004, Median raphe mediates estrogenic effect to the hippocampus in female rats, *European Journal of Neuroscience*, vol **19**, 309-317
- Rabin DS, 1998, Understanding why women won't take HRT. *Contemporary Ob/Gyn* **1**: 11-21
- Redish AD, Touretzky DS, 1998, The Role of The Hippokampus in Solving the Morris Water Maze, *J. Neural Computation* **10**, 73-111
- Rishi RK, 2002, Phytoestrogen in Health and Illness, *Indian Journal of Pharmacology* **34**: 311-320
- Shertzer, HG., Puga A, Chang C, Smith P, Nebert DW, Setchell KDR, Dalton TP, 1999, Inhibition of CYP1A1 enzyme activity in mouse hepatoma cell culture by soybeans isoflavones, *Chem-Biol interact* **123**:31-49.
- Sidharta P, Dewanto G, 1986, Susunan Saraf Pusat : Susunan limbik, hal 283-285, PT Dian Rakyat, Jakarta
- Sramek JJ, Cutler NR, 1999, Recent Developments in the Drug Treatment of Alzheimer's Disease, *Drugs and Aging* May **14** (5) : 359-373
- Strong R, Burke J. William, *CNS Disorder of Aging*, 1988, Raven Press, Chicago, p.2-8
- Strub RL, Black FW, 1985, The Mental Status Examination in Neurology, 2nd edition, FA Davis Company, Philadelphia, p. 77-100.
- Sturby T, Chan S, de Sa D, Dimmick J, 2000, A Reliable, Quicker Method for The Demonstration of Acetylcholinesterase (AChE) Activity in Mucosal Biopsies, *Pediatr Dev Pathol* **3**: 306
- Teery AV dan Buccafusco JJ, 2003. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease – Related Cognitive Deficits : Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development, *JPET* : 821-827
- Tran TD, Kelly SJ, 2003, Critical Periods for Ethanol-induced Cell Loss in The Hippocampal Formation, *J. Neurotoxicologi and Teratology* **25** : 519-528.
- Tri Lam T dan Leranth C, 2003, Role of the medial septum diagonal band of Broca cholinergic neurons in oestrogen-induced spine synapse formation on hippocampal CA1 pyramidal cell of female rats, *European Journal Neuroscience*, **17**: 1997-2005
- Van Praag H, Kempermann G, and Gage, F.H., 1999, Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus, *Nature Neuroscience* **2**, 266-270
- Whitten PL, Patisaul HB, 2001, Cross-Species and Interassay Comparisons of Phytoestrogen Action, *Environ Health Perspect* **109**(suppl 1): 5-20